

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Patent
Attorney Docket No. 026350-053

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Tetsuko TAKABE

Application No.: 09/870,501

Filing Date: June 1, 2001

Title: PEROXISOMAL ASCORBATE PEROXIDASE GENE INDUCED BY HIGH TEMPERATURE STRESS
AND A TRANSGENIC PLANT EXHIBITING THERMOTOLERANCE

Group Art Unit: 1638

Examiner: Cynthia E. Collins

Confirmation No.: 7822

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following priority foreign application(s) in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

Country: Japan

Patent Application No(s): 2000-172850

Filed: June 9, 2000

In support of this claim, enclosed is a certified copy(ies) of said foreign application(s). Said prior foreign application(s) is referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy(ies) is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620

Date: February 23, 2004

By

Erin M. Dunston

Registration No. 51,147

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy
of the following application as filed with this Office.

Date of Application : June 9, 2000

Application Number : Japanese Patent Application
No. 2000-172850

Applicant(s) : President of NAGOYA UNIVERSITY

Certified on July 28, 2000

Commissioner,
Patent Office

Kozo OIKAWA (Sealed)

Certification No. 2000-3059698

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy
of the following application as filed with this Office.

Date of Application : June 9, 2000

Application Number : Japanese Patent Application
No. 2000-172850

Applicant(s) : President of NAGOYA UNIVERSITY

Certified on July 28, 2000

Commissioner,
Patent Office

Kozo OIKAWA (Sealed)

Certification No. 2000-3059698

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 6月 9日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-172850

出 願 人

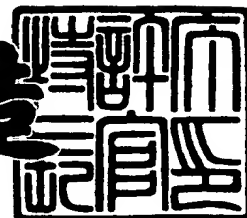
Applicant (s):

名古屋大学長

2000年 7月28日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3059698

【書類名】 特許願

【整理番号】 1999P190

【提出日】 平成12年 6月 9日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 A01H 1/00
C12N 15/29

【発明の名称】 熱ストレスにより誘導されるペルオキシソーム結合型アルコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子、耐暑性を付与した形質転換植物

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区園山町 1 - 2 1 - 4

【氏名】 高倍 鉄子

【特許出願人】

【識別番号】 391012224

【氏名又は名称】 名古屋大学長 松尾 稔

【代理人】

【識別番号】 100059258

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 暁秀

【選任した代理人】

【識別番号】 100072051

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】 100098383

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 純子

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709851

【書類名】 明細書

【発明の名称】 熱ストレスにより誘導されるペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子、耐暑性を付与した形質転換植物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 オオムギに由来し、以下の (a) または (b) に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする、ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼポリペプチド。

(a) 配列表の配列番号 1 に示す、アミノ酸番号 1 - 2 9 1 で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼポリペプチド。

(b) 熱ストレスにより発現が誘導され、(a) のアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加された、ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼポリペプチド。

【請求項 2】 請求項 1 記載のポリペプチドをコードする、遺伝子。

【請求項 3】 オオムギに由来し、以下の (c) または (d) に示す塩基配列からなることを特徴とする、遺伝子。

(c) 配列表の配列番号 2 に示す、塩基番号 1 - 1 0 8 9 で示される塩基配列からなることを特徴とする、ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子。

(d) 熱ストレスにより発現が誘導され、(c) の塩基配列の一部が欠失、置換若しくは付加された、ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子。

【請求項 4】 請求項 2 又は請求項 3 記載のペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子を植物に導入することにより、植物に耐暑性を付与する方法。

【請求項 5】 請求項 2 又は請求項 3 記載のペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子を植物に導入した、形質転換植物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、熱ストレスにより誘導される新規な遺伝子であるオオムギ由来ペルオキシソーム結合型アルコールピン酸ペルオキシダーゼ遺伝子、及び当該遺伝子を導入することにより得られた耐暑性を付与した形質転換植物に関する。

【0002】**【従来の技術】**

環境の変化や人口の増加により、将来の食糧危機が予想されている。その問題に対応するべく、農業において効率よく作物を生産するための技術開発が求められている。農業において、種々の環境ストレスにより生産量が減少することは大きな問題であり、種々の環境ストレスに強い植物を作出することが求められている。特に、地球の温暖化は大きな問題であり、植物の耐暑性を向上させる事の意義は特に大きい。

【0003】

これまで、遺伝子工学的に耐暑性を付与した例としては、熱ストレスにより誘導される熱ショック蛋白質をコードする遺伝子を利用した例がある。また、適合溶質であるグリシンベタインを少量合成させた例がある。また、近年環境ストレス耐性において活性酸素消去系の遺伝子の重要性が認識されてきている。これらを導入して光酸化障害、塩ストレス、乾燥ストレス耐性を付与した例もある。しかし、活性酸素消去系の遺伝子を導入することにより耐暑性を付与した例はこれまでなかった。

【0004】**【発明が解決しようとする課題】**

活性酸素消去系の重要性を示す知見より本発明者らは、従来の熱ショック蛋白質をコードする遺伝子ではなく、活性酸素消去系の遺伝子を利用して植物に耐暑性を付与できないか、と考えた。即ち、酸化ストレスを防御する遺伝子を導入することにより、植物に耐暑性を付与するという新たな手法を開発する事を目的として、その様な目的に使用できる新規の遺伝子を探索し、その塩基配列を決定することが、本発明の課題である。

【0005】

【課題を解決するための手段】

熱ストレスは、植物の生育及び生産性に影響を及ぼす因子の中でも、重要なものの1つである。生物は代謝を変化させることにより、高熱に素早く反応しているが、その様な代謝変化は細胞活性の複雑な再プログラミングに関与している。これらの変化は、ストレスにより引き起こされる障害に対して、細胞の重要な構造及び機能を保護するために働いている。熱ショックの結果として酸化ストレスが引き起こされ、その様な酸化ストレスは酸化ストレス防御に関与している遺伝子を誘導する。熱ストレス下では、過剰な活性酸素種(AOS:active oxygen species)が生成して、それにより細胞の構成物の酸化障害を引き起こす。その様な活性酸素種には、スーパーオキシドラジカル、過酸化水素、ヒドロキシラジカル等がある。

【0006】

植物の葉緑体及び細胞質における、過酸化水素に対する主要な防御システムは、いわゆるアスコルビン酸グルタチオンサイクルであり、そのサイクルにおいてはアルコルビン酸ペルオキシダーゼ (APXs) が主要酵素である。APX は光合成された過酸化水素の解毒に関与していると考えられている。その様なAPX の酵素活性は、干ばつ、塩害、冷害、大気汚染、過剰な光、紫外線、有害重金属、微量元素の欠乏の様な、多くのストレス状態に応答して増加することが示されてきた。

【0007】

これまでアルコルビン酸ペルオキシダーゼのアイソフォームについては、可溶性の細胞質型アルコルビン酸ペルオキシダーゼ、及び葉緑体型アルコルビン酸ペルオキシダーゼ（葉緑体結合同型、チラコイド結合同型）が知られていた。それらのアイソフォームに加えて近年、ペルオキシソーム及びグリオキシソームの膜に結合する、ペルオキシソーム結合同型アルコルビン酸ペルオキシダーゼのアイソフォームが、近年においていくつか報告されるようになってきた。即ち、ペルオキシソーム結合同型アルコルビン酸ペルオキシダーゼが、ワタ (Bunkelmann J.R. and Trelease R.N. (1996) Plant Physiology 110,589-598)、シロイヌナズナ (Zhang et al. (1997) Plant Molecular Biology 34,967-971) 及びホウレンソウ (Is hikawa T., et al. (1998) Plant and Cell Physiology 39,23-34) よりクロー

ニングされた。なお、本発明においては、これらの既知の配列を基にして遺伝子
を採取した訳ではない。

【0008】

ペルオキシソームはグリオキシソームと共に総称的にミクロボディーと呼ばれ、分子状酸素を用いる酸化反応を専門に行う小器官である。ペルオキシソームという名前は、ペルオキシソームに存在する酵素が分子状酸素を用いて、有機物質である基質から水素原子を奪う酸化反応を行い、過酸化水素 (hydrogen peroxide) を生じる反応が行われていることに由来している。また、ペルオキシソームにはカタラーゼも存在し、生じた過酸化水素を用いて、フェノール類、ホルムアルデヒド、アルコールなどを「過酸化反応」により酸化する反応も行われている。この様な酸化反応は有害分子の解毒にも関わっており、そのために肝臓や腎臓の細胞においては特に重要である。

【0009】

種々のストレス状態下においては、ミクロボディー基質における過酸化水素の産生が増加し、細胞質に拡散する。ペルオキシソーム結合型のアルコールビン酸ペルオキシダーゼはペルオキシソーム膜の外部に結合していると考えられており、過酸化水素の分解をおこなうことにより細胞の障害を防ぐのに重要な役割を果たしている。そのために、従来知られていた細胞質型又は葉緑体型アルコールビン酸ペルオキシダーゼと比較して、本発明のペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼは、ペルオキシソームにおいて生成した上述の活性酸素種を、細胞質に移行する前の早い時期に消去できる、という利点を有する。

【0010】

そこで本発明者らは、オオムギの葉より作製したcDNAライブラリーよりペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼを、ディファレンシャルディスプレイの手法により単離し、その遺伝子塩基配列を決定した。上で述べた様に、これまでに配列が得られたペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼは、ワタ、シロイヌナズナ及びホウレンソウは全て双子葉植物であり、単子葉植物からペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼが得られた例は、本発明が初めてである。ここで用いたディファレンシャルディスプレイ

法とは、真核細胞の遺伝子上で高頻度で出現する任意の配列を持つ一種の短いプライマーを用いてRT-PCRを行い、放射性同位元素でラベルした後、シーケンスゲルで分離、比較をする方法であり、非常に感度が高いという利点を有する。そのようにして塩基配列を決定した後、当該遺伝子の発現が熱ストレスにより誘導されることを示した。また、シロイヌナズナにおいて、当該遺伝子を過剰発現させた際に耐暑性が上昇することを示した。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明は、配列表の配列番号2に示す、塩基番号1-1089で示される塩基配列からなることを特徴とする、オオムギ由来のペルオキシソーム結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子である。当該遺伝子は植物の耐暑性に関与している遺伝子であり、熱ストレスにより発現が誘導されるという性質を有する。

【0012】

遺伝子組み換え技術によれば、基本となるDNAの特定の部位に、当該DNAの基本的な特性を変化させることなく、あるいはその特性を改善する様に、人為的に変異を起こすことができる。本発明により提供される天然の塩基配列を有する遺伝子、あるいは天然のものとは異なる塩基配列を有する遺伝子に関しても、同様に人為的に挿入、欠失、置換を行う事により、天然の遺伝子と同等のあるいは改善された特性を有するものとするのが可能であり、本発明はそのような変異遺伝子を含むものである。即ち、配列表の配列番号2に示す遺伝子の一部が欠失、置換若しくは付加された遺伝子とは、配列番号2に示す塩基配列において20個以下、好ましくは10個以下、更に好ましくは5個以下の塩基が置換若しくは付加された配列を有する遺伝子である。その様な遺伝子も、熱ストレスにより誘導されるというペルオキシソーム結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子の特徴を有する限り、本発明の範囲内である。

【0013】

更に本発明は、配列表の配列番号1に示す、アミノ酸番号1-291で示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、オオムギ由来のペルオキシソーム結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼポリペプチドである。当該ポリペプチドは

、配列表の配列番号 2 記載の塩基配列のオープンリーディングフレーム部分によりコードされるポリペプチドである。配列番号 1 に示すポリペプチドの一部が欠失、置換若しくは付加されたポリペプチドとは、配列番号 1 に示すアミノ酸配列において 2 0 個以下、好ましくは 1 0 個以下、更に好ましくは 5 個以下のアミノ酸が置換若しくは付加された配列を有するポリペプチドである。その様なポリペプチドも、熱ストレスにより誘導されるというペルオキシソーム結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼの特徴を有する限り、本発明の範囲内である。

【 0 0 1 4 】

ペルオキシソーム結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子を植物に導入して形質転換を行う方法、当該ペルオキシソーム結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子を導入して得た形質転換植物もまた、本発明の範囲内である。本発明のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子は、熱ストレスにより誘導される遺伝子であり、植物の自己防御に関与している。そのために、当該遺伝子を植物に導入する事により、植物に耐暑性を付与する事ができる。本発明の熱ストレス誘導遺伝子を導入する植物の例としては、オオムギ、コムギ、ユリ、イネ、トウモロコシ、アスパラガス等の単子葉植物、またシロイヌナズナ、タバコ、ニンジン、ダイズ、トマト、ジャガイモ等の双子葉植物が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

形質転換体の作製方法としては、本技術分野において知られている通常の方法を用いる事ができる。本発明において使用可能なベクターはプラスミドベクターであり、例えば実施例において使用している p B I 1 2 1、その他には p B I 2 2 1 等が挙げられるが、それらに限定されるものではない。そのようなベクターを、例えばアグロバクテリウム菌に導入して、当該アグロバクテリウム菌を目的とする植物に感染させることにより、形質転換植物を作製し、プラスミドベクターに組み込んだカナマイシン耐性等により、形質転換したものを選抜する事が可能である。更に、そのような形質転換植物に由来する種子を得る事が可能である。本発明の植物遺伝子を植物に導入する形質転換法はアグロバクテリウム法に限定されるものではなく、パーティクルガン法、電気穿孔法等の方法を用いる事も可能である。

【0016】

【実施例】

(植物材料)

オオムギ (*Hordeum vulgare* L. Haruna-nijyo) を、水道水で1000倍希釈したハイポネックスを用いて、生育チャンバー中において、1日の中で13時間を25℃で100 $\mu\text{E}\cdot\text{M}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の光条件下で、11時間を23℃の暗条件下で、70%の湿度において2-3週間水耕栽培を行った。塩ストレス処理のために、培養培地中のNaCl濃度を1日おきに100mM ずつ上昇させて、300mM まで上昇させて二日間保持した。熱ストレスは、全植物体を光条件下においてチャンバー内で37℃に24時間曝すことにより処理された。50 μM のABA (アブシジン酸) 及び1.5% (およそ440mM) の過酸化水素を、培養溶液に直接添加した。

【0017】

(ディファレンシャルディスプレイ)

SDS-フェノール法を用いて、オオムギよりRNA を単離した。第一鎖cDNAを、ランダムプライマー (6mer) を用いて、逆転写酵素により合成した。PCR 条件は、村本らの方法に従った (Muramoto Y. et al., Photosynthesis Mechanisms and Effects volume IV (eds Garab), pp. 3043-3046. Academic Publishers)。塩ストレスにより誘導されたPCR 断片を、pGEM-Tベクター (プロメガ) にクローン化した。DNA 配列は、DNA シークエンサー (ABI:373A) を用いた色素-プライマーシークエンシング法により決定した。BLAST ホモロジーサーチにより、APX の一部分をコードする部分配列を得た。

【0018】

(オオムギpAPXのクローニング及び配列決定)

塩ストレスを受けたオオムギの葉の相補的なDNA ライブラリーを調製した (Is hitani M. et al. (1995) Plant Molecular Biology 27, 307-315)。そのライブラリーを、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPにより、メガプライムDNA ラベリングシステム (アマシャム) によりラベルしたPCR フラグメントにより、スクリーニングした。ポジティブクローンをZAPII ベクターより切除し、製造者のプロトコールに従ってpBluscript中へ挿入した。DNA 配列は、上述の様に決定された。

【 0 0 1 9 】

(サザン及びノザンブロット解析)

オオムギから、ゲノムDNA を常法により単離した。ゲノムDNA を制限酵素であるBamHI, BglIII, EcoRI, EcoRV およびHindIII により分解し、0.8%アガロースゲルで分離した。ナイロン膜 (Hybond-N⁺、アマシャム) に転写した後、6XSSC, 5X Denhardt's, 0.1% SDS, 及び0.1mg/mlの変性ニシン精子DNA を含む溶液でハイブリダイゼーションを行った。膜を2XSSC 及び0.1% SDS中で洗浄し、その後1XSSC 及び0.1% SDS中で洗浄した。全てのハイブリダイゼーション及び洗浄は65℃で行った。20日目の植物を、上述した様なストレス温度に曝し、その後回収してRNA を抽出するために-80℃で貯蔵した。RNA は、ATA (aurine tricarboxylic acid) 法により単離した。20 µg の全RNA を、0.66M のホルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲルで分離し、ナイロン膜 (Hybond-N⁺、アマシャム) に転写した。全てのハイブリダイゼーション及び洗浄は、65℃で行った。シグナルの解析は、BAS2000 イメージアナライザーを用いて行った (Fuji)。

【 0 0 2 0 】

(発現プラスミドの構築と形質転換)

全長pAPX蛋白質をコードするpAPX配列を、CaMV 35Sプロモーターの制御下にバイナリーベクターpBI121に結合した (図1)。図1において、RBとLBはそれぞれ、右ボーダー配列、左ボーダー配列を、それぞれ示す。その後、エレクトロポレーションにより、プラスミドをアグロバクテリウムツメファシエン스에導入した。アグロバクテリウムを介したインプラントランスフォーメーション (Shimamoto K. and Okada K. ed. Experimental Protocol for Model Plants: Rice and Arabidopsis, SHUJUNSHA Co.Ltd, Tokyo, 1996) により、シロイヌナズナ (エコタイプコロンビア) にpAPXを導入した。回収した後、カナマイシンを含むMS培地に種子を蒔き、カナマイシン耐性植物 (T1) を回収した。形質転換した苗を、パーミキュライトの入ったポットに蒔き、それらを1000倍に希釈した水道水を含む水槽に移し、ポットの下部から水を供給できるようにし、T2の種子を得るために通常の条件で生育させた。

【 0 0 2 1 】

(形質転換植物による熱耐性試験)

野生型の種子及び選別された同遺伝子形質のT3形質転換株の種子を、水道水で1000倍に希釈したハイポネックスで灌水したバーミキュライト上に播種し、生育チャンバー中において、23℃で $100 \mu\text{E} \cdot \text{M}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の光条件で16時間、および23℃の暗条件下で8時間のサイクルで、50%の湿度でチャンバー中で3週間生育した。植物をチャンバー中で5日間35℃に曝し、通常状態のチャンバーに移植し回復させた。5日後に植物を回収し、緑色部分と黄色部分の新鮮重量を別々に秤量した。それぞれの実験は、5回繰り返して行った。

【0022】

(ペルオキシソーム結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼのクローニング)

RAPDプライマー (5'-CTTGAGCGTATT-3') を用いたDDRT-PCR (differential display reverse transcriptase PCR) により、塩ストレスをかけた葉より調製したmRNAが選択的に増幅された。配列決定をし、BLASTの相同性検索をしたところ、この断片はAPX遺伝子と高い相同性を有することが見出された。この断片をプローブとして用いて、塩ストレスをかけたオオムギの葉より調製したcDNAライブラリーより全長cDNAクローンを単離した。そのクローンは長さが1089bpであり、291個のアミノ酸から成るポリペプチドをコードする読み枠を含んでいた(図2)。図2において、膜貫通部位を下線で、長いC末端領域をイタリックで、それぞれ示す。その推定アミノ酸配列はワタ由来のミクロボディ型gmAPX蛋白質と75.3%の相同性を、シロイヌナズナ由来のペルオキシソーム型APX3蛋白質と72.1%の相同性を有していた。(図3)。特徴的な長いC末端部位及び膜貫通領域は共に保存されていることが見出された。単離されたクローンはペルオキシソーム結合型のアスコルビン酸ペルオキシダーゼをコードしており、それをpAPXと名づけた。

【0023】

(サザンブロット解析)

遺伝子のコピー数を決定するために、3'-UTRに150bpのC末端をコードする領域を含むDNA断片をプローブとして用いて、サザンブロット解析を行った。pAPXのcDNAは、一つの内部HindII制限酵素部位を有するが、BamHI, BglII, EcoRI 及び

EcoRV 制限酵素部位を有していなかった。図4において、レーン1はBamHI、レーン2はBglIII、レーン3はEcoRI、レーン4はEcoRV、レーン5はHindIIIにより分解を行った結果を示す。図4に見られる様に、厳しいハイブリダイゼーション条件下においては、BamHI, BglIII, EcoRI 及びEcoRV 中の消化物の1つのバンド、およびHindIII 分解産物の2つのバンドのみが検出された。これは、オオムギのゲノムにおいて、pAPXは単一コピーによりコードされることを示している。

【0024】

(熱及び他のストレス下におけるpAPX遺伝子の発現)

図5に種々のストレス処理を行った際のpAPXの発現を、ノザンブロットで解析した結果を示す。図5において、Cのレーンはコントロールを、Saltのレーンは300mMのNaClの高塩処理を、ABAのレーンは50 μ M アブシジン酸(ABA)処理を、H₂O₂のレーンは1.5%過酸化水素処理を、Heatのレーンは37℃で24時間の処理を、それぞれ示す。また、上段のAにおいてはpAPX cDNAの3'-UTRを含む特異的プローブを用いて検出を行った結果を、下段のBにおいてはEtBrにより変化しないコントロールである25S rRNAを可視化した結果を、それぞれ示す。RNAブロット解析(図5)の結果は、pAPX転写レベルは塩と熱ストレス下において明らかに上昇することを示唆している。ABAの添加により、より高度なpAPX遺伝子発現の誘導が引き起こされた。しかしながら、過酸化水素を植物根の生育培地に直接添加しても、発現誘導は起こらなかった。

【0025】

(pAPXを過剰発現した形質転換シロイヌナズナの耐暑性)

アグロバクテリウムツメファシエンスで感染させたシロイヌナズナ植物より回収したT0種子のプールより、全部で8つの独立した形質転換系(T1)を、カナマイシン耐性培地からスクリーニングした。自家受粉をした後、T2子孫をカナマイシン含有培地に再び置いて、分離解析を行った。分離解析の結果、単一のT-DNAが6つの系統で挿入されていることが見出された。野生型及びT2形質転換系統よりゲノムDNAが単離され、131-916bp及び131-511bpを示すpAPXの2セットのプライマーを用いて、PCRにより更に解析した。図6にその結果を示す。図6において、左側はpAPX配列の131-916bpの部位を表すPCR産物を示し、右側はpAPX配

列の131-511bp の部位を表すPCR 産物を示す。また、WTは野生型のシロイヌナズナ株を、pAPX1,pAPX2,pAPX3,pAPX5,pAPX7,pAPX8 はそれぞれ独立した形質転換シロイヌナズナ株を示す。図6の結果より、野生型の植物体からDNA 断片は増幅されなかったが、一方試験した全ての形質転換株のDNA から、380bp 又は785bp の予想された長さの断片が増幅された。それは、これらの系統がオオムギのpAPX遺伝子を外来遺伝子として含んでいることを示している。T3の形質転換系は、T2を再び自家受粉することにより作製された。これらから得た50-60 個の種子を、カナマイシンを含有するMS培地に植えて同遺伝子形質の系統の選抜を行ったところ、その系統の子孫は全てカナマイシン耐性を示した。それらの同遺伝子形質の系統のみ、更なる解析及び耐暑性試験に用いた。

【0026】

野生型 (WT) 及び形質転換したシロイヌナズナの苗の両者につき、pAPX転写産物レベルをノーザンブロット解析によりチェックした。図7にpAPXを過剰発現させた形質転換T2株を、pAPXをプローブとして用いてノーザンブロット解析した結果を示す。図7のAは、全長の野生型及び形質転換株であるpAPX1,pAPX2,pAPX3,pAPX5,pAPX7,pAPX8 についてオオムギ特異的なpAPXプローブとハイブリダイズする転写産物を検出した結果を、図7BはEtBrを用いて可視化した変化しないコントロールである25S rRNAを検出した結果を、それぞれ示す。図7に示す様に、野生型植物体はpAPXプローブとハイブリダイズする転写産物を含有しないが、全ての形質転換系統は多量のpAPX転写産物を含んでいた。それらの中で、pAPX1, pAPX2 及びpAPX3 は高いレベルを有していたが、一方pAPX5 及びpAPX7 は比較的低いレベルであった。pAPX8 においては、pAPXの発現は非常に低かった。

【0027】

3週齢の植物を熱ストレスに曝した時、全ての形質転換系統は野生株と比較して、高熱ストレスに耐性を示す傾向を示した。図8に、3週齢のシロイヌナズナを37℃の熱ストレスに5日間曝して、更に5日間通常の条件に移した植物体につき、全葉のうち緑色部分のパーセンテージを評価した結果を示す。pAPX5 及びpAPX1 系統において、全体に占める緑色部分のパーセンテージは、野生株と比較して有意に (5%レベルで) 高かった (図8)。しかしながら、形質転換系統の中で

は耐暑性はpAPX転写産物レベルと相関しなかった。なぜならば、転写産物レベルが低いpAPX5 系統の方が、高い転写産物レベルを有するpAPX1-3 系統と比較して、高熱ストレスに対する耐性がより高かった。また図9に、野生型とpAPXで形質転換した植物体につき、熱ストレスを与えた後の生育状態の写真を示す。従って、mRNAをそこそこに発現させた形質転換体が強い耐暑性を示すことが判明した。このことは、活性酸素消去系の他の遺伝子産物とのバランスが重要であることを示唆している。図9より、形質転換したシロイヌナズナは野生株と比較して熱ストレス後も良い生育を示し、耐暑性が向上していることが示された。

【 0 0 2 8 】

【発明の効果】

本発明により、熱ストレスにより誘導される新規な遺伝子であるオオムギ由来ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子、及び当該遺伝子を導入することにより得られた耐暑性を付与した形質転換植物が与えられた。本発明の方法は、植物に耐暑性を付与するための新たな手段を与えるものである。

【0029】

【配列表】

<110>出願人氏名：名古屋大学長

<120>発明の名称：熱ストレスにより誘導されるペルオキシソーム結合型アルコールリン酸ペルオキシダーゼ遺伝子、耐暑性を付与した形質転換植物

<160>配列の数：2

<210>配列番号：1

<211>配列の長さ：291

<212>配列の型：アミノ酸

<213>起源：オオムギ葉由来ペルオキシソーム結合型アルコールリン酸ペルオキシダーゼ

<400>配列

| | |
|---|-----|
| MAAPVVDAEY LRQVDRARRA FRALIASKGC APIMLRLAWH DAGTYDVNTR TGGANGSIRY | 60 |
| EEEYTHGSNA GLKIAIDLLE PIKAKHPKIT YADLHQLAGV VAVEVTGGPT VEFIPGRRDS | 120 |
| SVCPREGRLP DAKKGAPHLR DIFYRMGLTD KDIVALSGGH SLGKAHPERS GFDGAWTRDP | 180 |
| LKFDNSYFLE LLKGESEGLL KLPTDKALLD DPEFRRYVEL YAKDEDVFFK DYAESHKKLS | 240 |
| ELGFTPRSSG PASTKSDVST AVVLAQSAVG VAVAAAVVIA GYLVEASKRS K | 291 |

< 2 1 0 > 配列番号 : 2

< 2 1 1 > 配列の長さ : 1 0 8 9

< 2 1 2 > 配列の型 : 核酸

< 2 1 3 > 起源 : オオムギ葉由来ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼ

< 4 0 0 > 配列

| | |
|--|------|
| CTTCTAGGGT CGTCCGCGAT GCGGGCTCCG GTGGTGGACG CCGAGTACCT GCGCCAGGTC | 60 |
| GACAGGGCGC GCCGCGCCTT CCGTGCCCTC ATCGCCTCCA AGGGATGCGC CCCCATCATG | 120 |
| CTCCGCTCG CATGGCATGA TGCTGGCACC TATGATGTGA ACACAAGAAC TGGTGGTGCA | 180 |
| AATGGTTCAA TTAGATACGA GGAAGAGTAC ACCCATGGTT CAAATGCTGG CTTAAAAATT | 240 |
| GCTATTGATC TCCTTGAGCC TATTAAAGCG AAGCATCCAA AGATTACATA TGCAGACCTT | 300 |
| CATCAGCTTG CCGGAGTAGT TGCAGTTGAA GTCACCGGGG GTCCAACCGT TGAGTTCATC | 360 |
| CCTGGAAGAC GTGATTCGTC AGTTTGTCCC CGTGAAGGAC GCCTTCCTGA TGCTAAGAAA | 420 |
| GGTGCACCAC ATCTAAGGGA CATCTTTTAT CGAATGGGGT TAACAGACAA AGATATTGTA | 480 |
| GCACTATCTG GGGGGCACAG CCTGGGAAAAG GCGCATCCTG AAAGGTCTGG GTTTGACGGT | 540 |
| GCATGGACTC GTGACCCTCT GAAATTTGAC AACTCATACT TTCTTGAGCT ACTGAAGGGG | 600 |
| GAATCTGAGG GTCTTCTGAA GCTCCCTACT GATAAGGCAT TGTTGGATGA TCCTGAATTT | 660 |
| CGACGCTATG TGGAGCTTTA TGCAAAGGAT GAGGATGTTT TCTTCAAGGA CTACGCTGAA | 720 |
| TCACACAAAA AACTTTCTGA ACTTGGCTTC ACACCACGGA GCAGTGGCCC AGCATCTACA | 780 |
| AAATCAGATG TTTCAACTGC TGTGTACTT GCACAGAGTG CAGTCGGGGT AGCAGTTGCT | 840 |
| GCAGCTGTAG TTATCGCGGG CTACCTGTAC GAAGCTTCCA AGAGGAGCAA GTAAGGGGTT | 900 |
| CGTGAGTTCT TGGATGACAT TCCCTTATTT AGTAAGTATC AAGTTATTAT TCTAAAAAAA | 960 |
| TAAGTGCCAA GTGCAAATAA CAGAACTCTA GTGATGAACA ACCAACAGTA GTCTCAAAAT | 1020 |
| ATTCATACA TTCTTGAGGA CATCTCCTTC ATATATATAC ATCATACTTG AATAAAAAAA | 1080 |
| AAAAAAAAA | 1089 |

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、シロイヌナズナの形質転換のために構築されたオオムギ由来pAPX過剰発現ベクターの模式図である。

【図2】 図2は、オオムギ由来ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。

【図3】 図3は、オオムギ由来ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼのアミノ酸配列をワタ、シロイヌナズナの配列と比較した図である。

【図4】 図4は、オオムギ由来ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼを、オオムギpAPX特異的DNA配列をプローブとして用いて、サザンブロットにより検出した図である。

【図5】 図5は、オオムギ緑葉における熱ストレス及び他の種々のストレス処理によるpAPX遺伝子の誘導を、オオムギpAPX特異的DNA配列をプローブとして用いて、ノザンブロットにより検出した図である。

【図6】 図6は、野生株及び形質転換植物につき、オオムギ由来pAPX遺伝子の存在をPCRで解析した図である。

【図7】 図7は、野生型及びオオムギ由来pAPX遺伝子を過剰発現した形質転換植物のT2世代につき、ノザンブロット解析を行った図である。

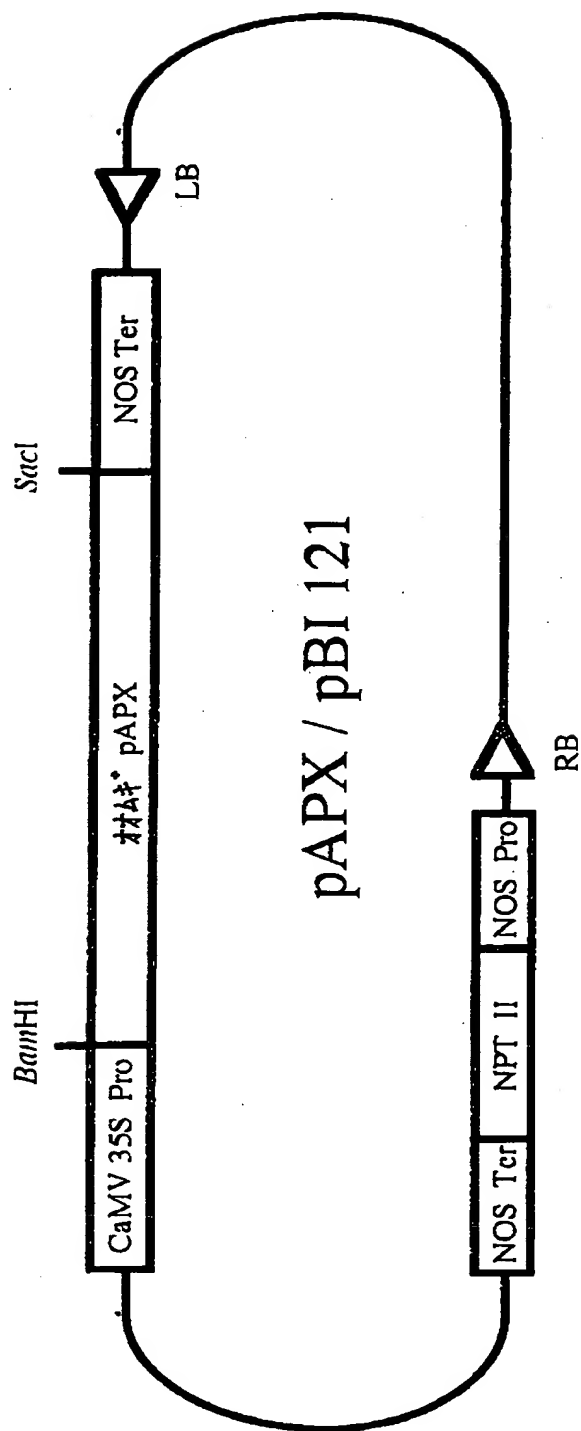
【図8】 図8は、野生型及びpAPXで形質転換した植物体につき、全葉の中における緑色の部分の新鮮重量により耐暑性を比較したグラフである。

【図9】 図9は、野生型及びpAPXで形質転換した植物体につき、熱ストレス後の生育を比較した写真である。

【書類名】

図面

【図 1】



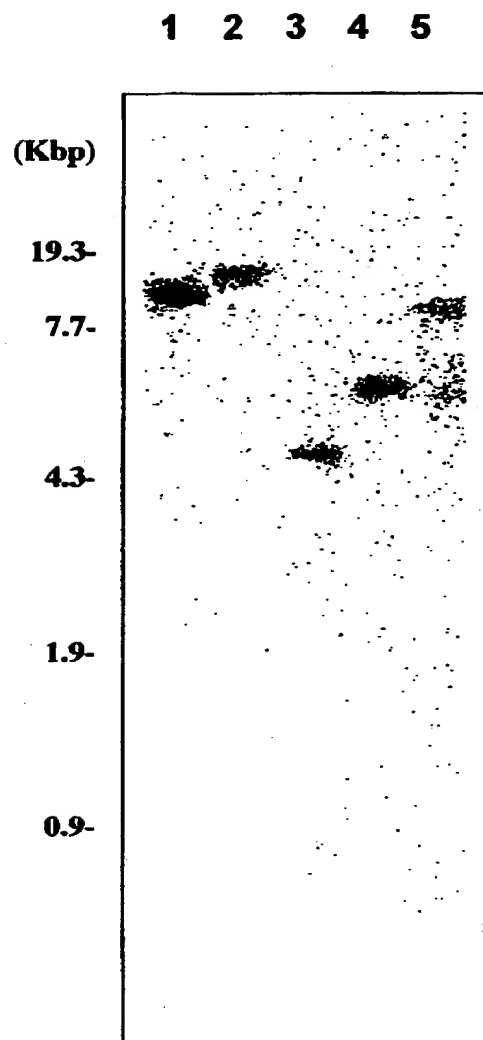
【図 2】

CTTCTAGGGTCGTCGGGCTCCGGTGGTGGACGCCGAGTACCTGCCCAGGTC
M A A P V V D A E Y L R Q V
GACAGGGCGCGCGCCCTTCGGTGCCTCATCGCTCCAGGATCGCCCATCATG
D R A R R A F R A L I A S K G C A P I M
CTCCGCTCGCATGGCATGATGGGACCTATGATGTGAACACAAGACTGGGTGCA
L R L A W H D A G T Y D V N T R T G G A
AATGGTTCAATAGATACGAGGAGAGTACACCCATGGTTCAATGCTGGCTTAAAAATT
N G S I R Y E E Y T H G S N A G L K I
GCTATTGATCTCCTTGAGCCTATTAAAGCGAAGCTCCAAAGATTACATATGACAGACCTT
A I D L L E P I K A K H P K I T Y A D L
CATCAGCTTGGCGGAGTAGTTGAGTTGAAGTCAACCGGGGTCACACCGTTGAGTTCATC
H Q L A G V V A V E V T G G P T V E F I
CCTGGAAGACGTGATTCGTAGTTGTCCCGTGAAGGACGCTTCTCTGATGCTAAGAAA
P G R R D S S V C P R E G R L P D A K K
GGTGACCCACATCTAAGGACATCTTTTATCGAATGGGTTAACAGACAAAGATTGTGA
G A P H L R D I F Y R M G L T D K D I V
GCACTATCTGGGGGACACAGCCTGGGAAAGCGGATCCTGAAGGTCTGGGTTGACGGT
A L S G G H S L G K A H P E R S G F D G
GCATGGACTCGTGACCTCTGAAATTTGACAACATCATACTTTCTTGAGCTACTGAAGGGG
A W T R D P L K F D N S Y F L E L L K G
GAATCTGAGGGTCTTCTGAAGCTCCCTACTGATAAGGCATTGTGGATGATCCTGAATTT
E S E G L L K L P T D K A L L D D P E F
CGACGCTATGTGGAGCTTTATGCAAGGATGAGGATGTTTCTTCAAGGACTACCTGAA
R R Y V E L Y A K D E D V F F K D Y A E
TCACACAAAACTTTCTGAACCTGGCTTCACACCGGAGGACGAGTGGCCCGCATCTACA
S H K K L S E L G F T P R S S G P A S T
AAATCAGATGTTTCAACTGCTGTTGTACTTGCACAGAGTGCAGTGGGGGTAGCACTTGGCT
K S D V S T A V V L A Q S A V G V A V A
GCAGCTGTAGTTATCGCGGCTACCTGTACGAAGCTTCCAAGAGGAGCAAGTAAGGGGTT
A A V V I A G Y L Y E A S K R S K * 291
CGTGAGTTCTTGGATGACATTCCTTATTTAGTAAGTATCAAGTTATTATCTTAAAAAA
TAAGTGCCCAAGTGCAATAACAGAACTCTAGTGTGTGAACCAACCAAGTAGTCTCAAAAT
ATTCATACATCTTGGAGGACATCTCCTTCATATATATACATCATCTACTTGAATAAAAAA
AAAAAAAA 1089

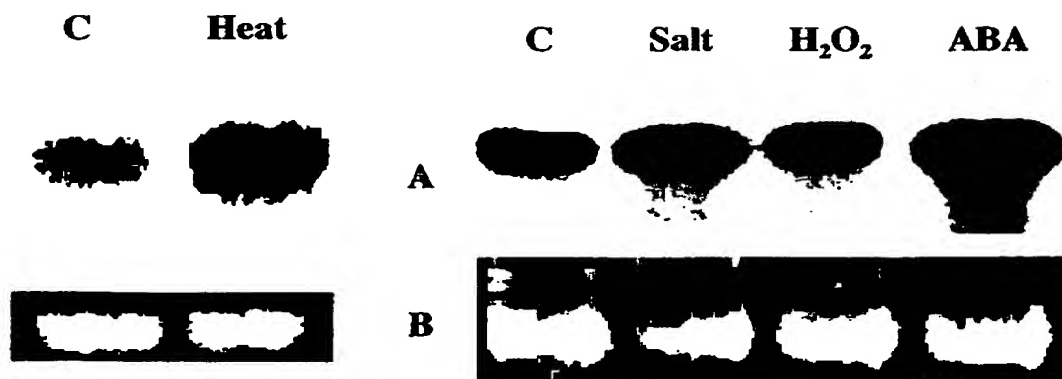
【 図 3 】

| | | |
|------|--------------------------|---|
| PAPX | MAAPVVDAAEYLRQVDRARRAFRA | LIASKGCCAPIMLRLAWHDAGTYDVNTRTGG |
| GAPX | MAFPVVDTEYLKEIDKARRDLRA | LIALKNCAPIMLRRLAWHDAGTYDVSTKTGGP |
| APX3 | MAAPIVDAEYLKEITKARRELRS | LIANKNCAPIMLRRLAWHDAGTYDAQSKTGGP |
| PAPX | NGSIRYEEEEYTHGSA | GLKIAIDLLEPIKAKHPKITYADLHQLAGWVAVEVTGG |
| GAPX | NGSIRNEEEYTHGANS | GLKIAIDFCEEVKAKHPKITYADLYQLAGWVAVEVTGG |
| APX3 | NGSIRNEEEYTHGANS | GLKIAIDLCEGVKAKHPKITYADLYQLAGWVAVEVTGG |
| PAPX | PTVEFI | PGRRDSSVCPREGRLPDARKGAPHLRDI |
| GAPX | PTIDFV | PGRKDSNICPREGRLLPDARKGAPHLRDI |
| APX3 | PDIVFV | PGRKDSNVCPKEGRLLPDARKQGFQHLRDI |
| PAPX | GKAHPERSGFDGAWTRD | PLKFDNSYFLELLKGESEGLLKLPDTKALLDDPEFRR |
| GAPX | GRAHPERSGFDGFWTNE | PLKFDNSYFLELLKGESEGLLKLPDTKALLDDPEFRR |
| APX3 | GRAHPERSGFDGFWTQ | EPLKEDNSYFVELELLKGESEGLLKLPDTKALLDDPEFRR |
| PAPX | YVELYAKDEDAE | FFKDYAESHKKLSELGFTTFRSSGPASTKSDVSTAVVLAQSAVVG |
| GAPX | YVELYAKDEDAE | FFRDYAESHKKLSELGFTTPTSARSKVMVKD-ST-V-LAQGAVG |
| APX3 | LVELYAKDEDAE | FFRDYAESHKKLSELGENENSSAGKA-VAD-STI---LAQSAFG |
| PAPX | VAVAAAVV | IAGYLVEASKRSK |
| GAPX | VAVAAAVV | ILSYFYEVRKRMK |
| APX3 | VAVAAAVV | AFGYFYEIRKRMK |

【図 4】



【図 5】



【図6】

M_ WT pAPX1 pAPX2 pAPX3 pAPX5 pAPX7 pAPX8 _ WT pAPX1 pAPX2 pAPX3 pAPX5 pAPX7 pAPX8 _M

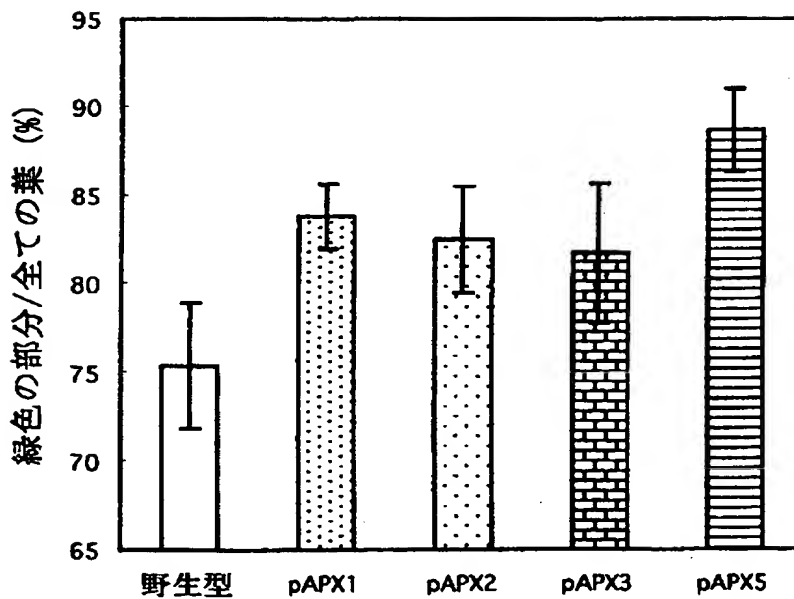


【図7】

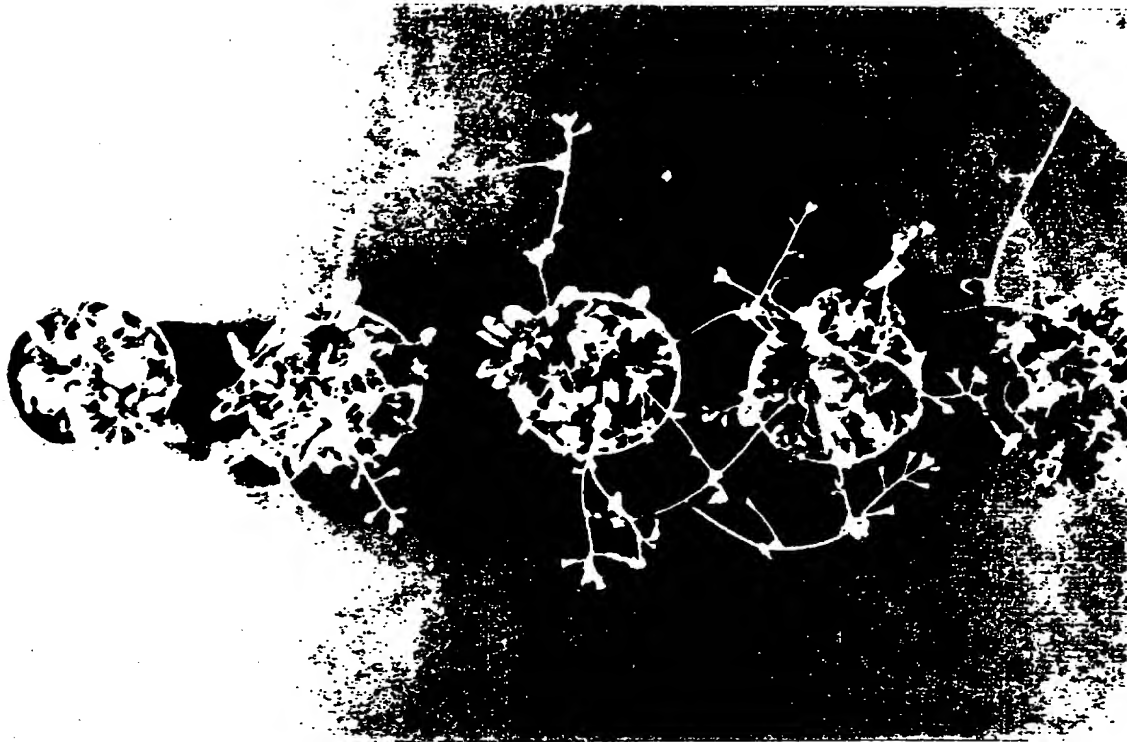


野生型 pAPX1 pAPX2 pAPX3 pAPX5 pAPX7 pAPX8

【図8】



【図9】



野生型

pAPX1

pAPX2

pAPX3

pAPX5

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 植物に耐暑性を付与するための、新たな手段を得る。

【解決手段】 本発明により、熱ストレスにより誘導される新規な遺伝子であるオオムギ由来ペルオキシソーム結合型アルコールビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子、及び当該遺伝子を導入することにより得られた耐暑性を付与した形質転換植物が与えられた。

【選択図】 なし

認定・付加情報

| | |
|---------|---------------|
| 特許出願の番号 | 特願2000-172850 |
| 受付番号 | 50000715774 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第二担当上席 0091 |
| 作成日 | 平成12年 6月12日 |

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

| | |
|----------|---------------------|
| 【識別番号】 | 391012224 |
| 【住所又は居所】 | 愛知県名古屋市千種区不老町（番地なし） |
| 【氏名又は名称】 | 名古屋大学長 |

【代理人】

| | |
|----------|------------------------|
| 【識別番号】 | 100059258 |
| 【住所又は居所】 | 東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階 |
| 【氏名又は名称】 | 杉村 暁秀 |

【選任した代理人】

| | |
|----------|------------------------|
| 【識別番号】 | 100072051 |
| 【住所又は居所】 | 東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階 |
| 【氏名又は名称】 | 杉村 興作 |

【選任した代理人】

| | |
|----------|---|
| 【識別番号】 | 100098383 |
| 【住所又は居所】 | 東京都千代田区霞が関3丁目2番4号 霞山ビル ディング7階 杉村萬國特許事務所内 |
| 【氏名又は名称】 | 杉村 純子 |

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[391012224]

1. 変更年月日 1991年 1月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市千種区不老町(番地なし)

氏 名 名古屋大学長